

2021 年度臨床研究推進研究費報告書

提出年月日: 2022 年 6 月 30 日

代表者	氏名	永田矩之	所属	附属動物病院
	内線	9588	e-mail	nnagata@vetmed.hokudai.ac.jp
研究課題	LC-MS/MS を用いた犬尿中ステロイドホルモン分析法の確立と診断への応用			
研究チーム参加者	氏名	所属		役割
	永田矩之	附属動物病院		サンプル採取、データ解析
	池中良徳	附属動物病院		LC-MS/MS を用いた分析
研究期間	2021 年 7 月 ~ 2022 年 3 月			
研究目的と成果の概要 (400 字以内)	本研究では、動物にとってストレスのない環境下で侵襲なく採取可能な尿に注目し、液体クロマトグラフィー・質量分析法 (LC-MS/MS) による尿中ステロイドホルモン網羅的測定法を開発した。19 種のステロイドホルモンを対象とし、健康犬 58 頭において基準値を設定した。副腎皮質機能亢進症の犬 11 例と非副腎疾患の犬 12 例で比較した結果、コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、11-デオキシコルチゾール、プロゲステロンおよびプレグネノロンの 6 種が副腎皮質機能亢進症で有意に高値だった。診断性能はコルチコステロンで最も高かった。免疫学的測定法と LC-MS/MS で測定したコルチゾールには強い相関がみられたが、すべてのサンプルで免疫学的測定法が LC-MS/MS より高値を示した。今後は症例数を増やし、副腎悪性腫瘍のマーカー探索や、複数のステロイドホルモン測定値の組み合わせによる診断性能を検討していく予定である。			

研究方法、結果、考察、成果の公表 (上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい)

【方法】

2021 年 2 月から 2021 年 11 月の間に健康診断のために尿検査を実施した犬 58 頭 (健康群) と、症状や臨床所見から副腎皮質機能亢進症が疑われた犬 23 例を対象とした。副腎皮質機能亢進症 (11 例) の確定診断は、トリロスタンに対する治療反応が認められた場合とした。他の疾患が確定した症例を非副腎疾患群 (12 例) とした。尿は飼い主が自宅で採取し、分析まで -80°C で保存した。

尿中のコルチゾール、コルチゾン、11-デオキシコルチゾールと、その代謝産物であるテトラヒドロコルチゾール (THF)、テトラヒドロコルチゾン (THE)、テトラヒドロ-11-デオキシコルチゾール (THS) を含む 19 種類のステロイドホルモンを分析対象とした。定量は、内部標準法を用いた LC-MS/MS 分析により濃度を算出し、測定値は尿中クレアチニン濃度で補正した。尿中コルチゾールについては、免疫学的測定法との相関を解析した。健康群の分析データから、各ホルモンの基準値を robust 法により設定した。副腎皮質機能亢進症群と非副腎疾患群の 2 群間で尿中ステロイドホルモン濃度を比較した。ROC 解析を行い、各ホルモンの診断精度を検証した。

本研究は北海道大学動物医療センター臨床研究倫理委員会の承認を得た上で実施し (承認番号 2021-06)、サンプルの採取ならびに本研究での使用に関して動物の飼い主には口頭および書面にて説明し同意を得た。

【結果】

健康群の分析データから、尿中の各ステロイドホルモンの基準範囲上限値を設定した。

副腎皮質機能亢進症群と非副腎疾患群で比較した結果、コルチゾール、コルチゾン、コルチコステロン、11-デオキシコルチゾール、プロゲステロンおよびプレグネノロンの6種が副腎皮質機能亢進症群で有意に高値だった(図)。

診断性能はコルチコステロンで最も高く(AUC 0.98)、コルチゾールのAUCは0.89だった。免疫学的測定法とLC-MS/MSで測定したコルチゾールには強い相関がみられたが、すべてのサンプルで免疫学的測定法がLC-MS/MSより高値を示した。

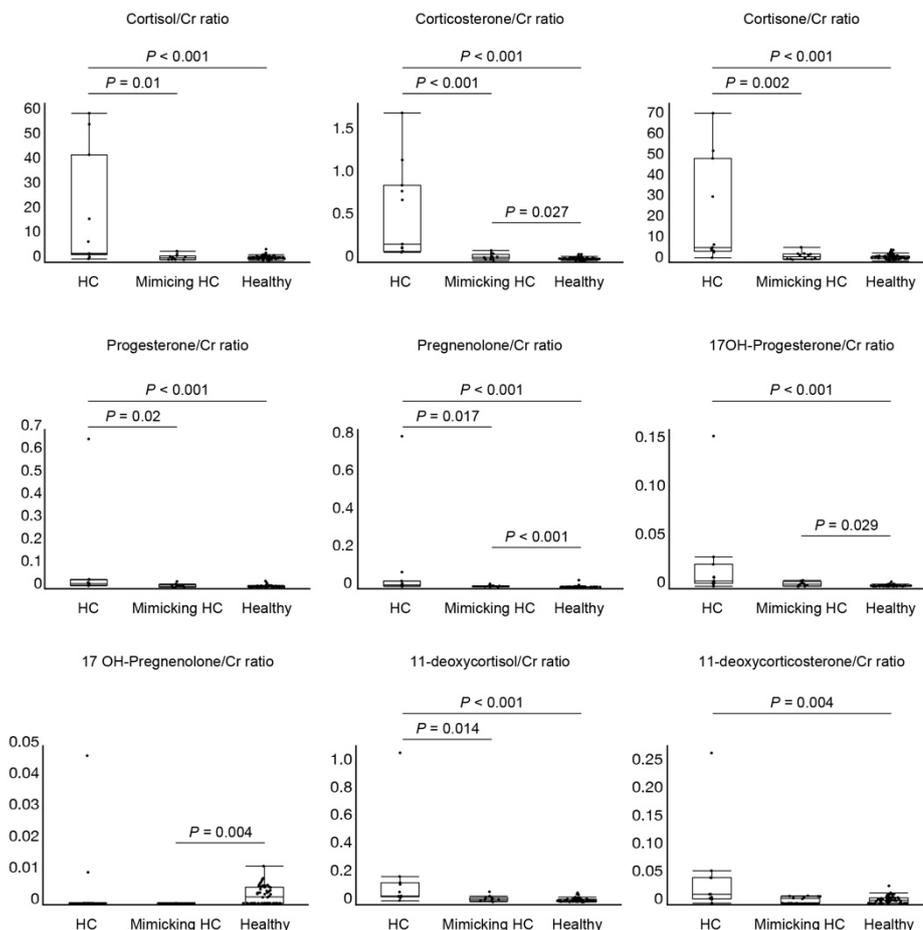


図. 副腎皮質機能亢進症群 (HC, n = 11)、非副腎疾患群 (Mimicking-HC, n = 12)、および健康群 (Healthy, n = 58) の尿中ステロイドホルモン (一部抜粋) の比較。測定値は尿中クレアチニン濃度 (Cr) で補正している。

【考察】

本研究では、LC-MS/MSを用いた尿中ステロイドホルモンの分析法を開発した。健康な犬において尿中の各ステロイドホルモンの基準範囲上限値を設定するとともに、犬の副腎皮質機能亢進症の診断に対する有用性を予備的に評価した。今回開発した方法は、比較的簡便な手順で複数の尿中ステロイドホルモンを一斉かつ高感度に分析することが可能である。犬の副腎皮質機能亢進症では尿中コルチゾールだけでなく、他のステロイドホルモンも有意に上昇しており、本研究では尿中コルチコステロンの診断能が最も高かった。

副腎皮質機能亢進症群 11 例と 非副腎疾患群 12 例の尿中ステロイドホルモンを比較すると、コルチゾール、コルチコステロン、コルチゾン、プロゲステロン、プレグネノロン、11-デオキシコルチゾールの 6 種のステロイドホルモンで有意差が認められた。コルチコステロンがコルチゾールよりも副腎皮質機能亢進症の診断に優れていた理由は明らかではないが、コルチコステロンとアルドステロンを分泌する副腎皮質腫瘍が犬で報告されていることから (Behrend EN, et al. J Am Vet Med Assoc.

2005)、本研究で副腎皮質腫瘍と診断された犬の一部には、主にコルチコステロンを分泌する症例が含まれていた可能性が考えられた。下垂体性副腎皮質機能亢進症と診断された犬の中にも、コルチゾールが比較的低値でコルチコステロンが比較的高値を示す例があり、個々の症例でステロイドホルモンプロファイルが異なる可能性が示された。

ヒトにおいて、尿中ステロイドプロファイル解析が副腎皮質腫瘍の良悪鑑別に有用であることが示されており、悪性腫瘍では THS などの増加が認められる (Araujo-Castro M, et al. Endocrine. 2021)。本研究には病理組織学的に副腎皮質腺癌と診断された犬は含まれていなかったため、悪性度評価における有用性は検討できていない。犬では副腎皮質腫瘍の悪性、良性を鑑別する有用なバイオマーカーが存在しないため、ステロイドホルモンプロファイルは副腎皮質悪性腫瘍を早期に発見するための有望なバイオマーカーとして期待される。

本研究では LC-MS/MS を用いた尿中ステロイドホルモンの測定系を開発した。開発した測定系を用いて尿中ステロイドホルモンの基準値上限を設定し、予備的研究により臨床的に有用であることが示唆された。今後は症例数を増やし、副腎腫瘍の悪性度評価のためのマーカーの探索や、複数のステロイドホルモン測定値の組み合わせによる診断性能を検討していく予定である。

【成果の公表（代表的なもの）】

・論文発表

Nagata N, Sawamura H, Morishita K, Hosoya K, Yokoyama N, Sasaoka K, Sasaki N, Nakamura K, Ikenaka Y, Takiguchi M. Urinary corticoid to creatinine ratios using IMMULITE 2000 XPi for diagnosis of canine hypercortisolism. J Vet Med Sci, in press.

・学会発表

澤村飛龍, 永田矩之, 森下啓太郎, 細谷謙次, 佐々木東, 中村健介, 滝口満喜, 池中良徳. 犬のクッシング症候群に対する非侵襲的で高精度な診断法を目指した尿中ステロイドホルモンの網羅的測定. 第 18 回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2022.